

Paris 1972

UNIVERSITE RENE DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE NECKER - ENFANTS MALADES

Année 19

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

M a r i e - A n n e B A C H née L A B O R D E

née le 27.8.45 à Entrains (58)

Présentée et soutenue publiquement le

1972

"ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES IMMUNOSUPPRESSEURS
PAR LA CULTURE MIXTE DE LYMPHOCYTES"

Président : M. HAMBURGER, Professeur

-:-:-:-:-

U N I V E R S I T E R E N E D E S C A R T E S
F A C U L T E D E M E D E C I N E N E C K E R - E N F A N T S M A L A D E S

Année 19

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

M a r i e - A n n e B A C H née L A B O R D E

née le 27.8.45 à Entrains (58)

Présentée et soutenue publiquement le

1972

"ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES IMMUNOSUPPRESSEURS
PAR LA CULTURE MIXTE DE LYMPHOCYTES"

Président : M. HAMBURGER, Professeur

-:-:-:-:-:-:-:-



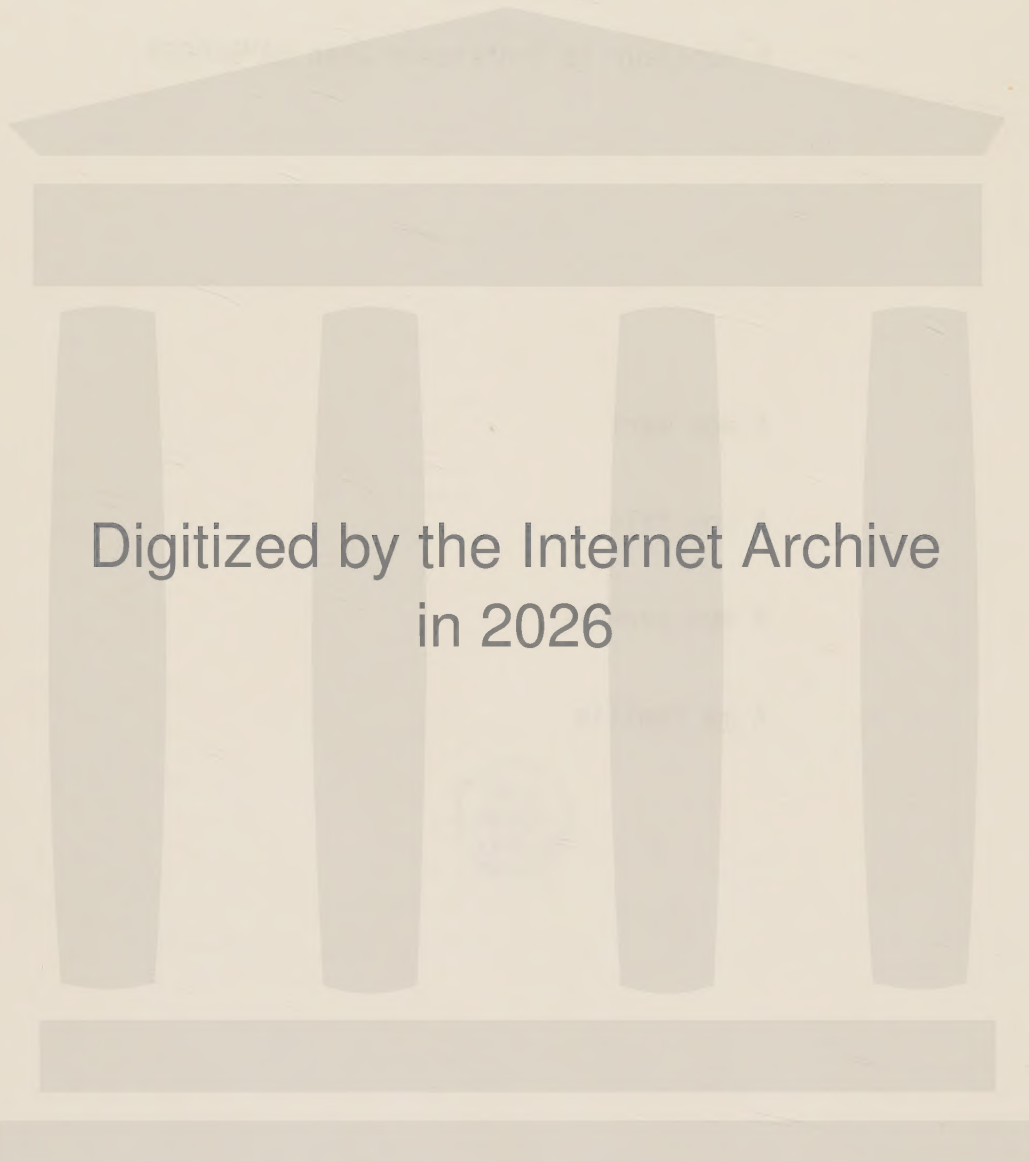
A Monsieur le Professeur Jean HAMBURGER

A mon mari

A mon fils

A mes parents

A ma famille



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547103_0037

INTRODUCTION

REVUE GENERALE DU MODE D'ACTION DES IMMUNOSUPPRESSEURS AU NIVEAU CELLULAIRE

- 1 - Introduction
- 2 - Azathioprine
- 3 - Améthoptérine
- 4 - Cyclophosphamide
- 5 - Cytosine Arabinoside
- 6 - Corticoïdes
- 7 - Sérums antilymphocytes

PARTIE EXPERIMENTALE : Inhibition de la culture mixte de lymphocytes par les antimétabolites

- 1 - Introduction
- 2 - Matériel et Méthodes
- 3 - Résultats
 - . Action de l'azathioprine
 - . Action du méthotrexate
 - . Action du sérum de sujets ayant ingéré de l'azathioprine
- 4 - Discussion

CONCLUSIONS

dans l'organisme à un niveau immunogénique pendant plusieurs jours. Il apparaît donc que l'interprétation de BERENBAUM n'est pas absolument concluante car elle ne tient pas compte des facteurs énumérés ci-dessus. (métabolisme et réversibilité rapides de l'AZ, persistance de l'immunogénicité pendant quelques jours). Un système purement *in vitro*, tel que le réalise la culture mixte de lymphocytes, permet de contrôler ces facteurs. Nous l'avons appliqué à l'AZ et à l'améthoptérine (Méthotrexate, MTX) (20). Il est apparu que l'AZ et le MTX inhibent tous deux l'incorporation de thymidine par les lymphocytes en culture mixte à des concentrations non cytotoxiques lorsqu'ils sont introduits dans la culture à son début. Placé dans la culture après la 24ème heure, l'AZ n'est plus efficace, par contre le MTX le reste s'il est introduit jusqu'au 4ème jour. Cette chronologie de l'action de l'AZ est au moins aussi compatible avec une action sur la reconnaissance de l'antigène que sur la prolifération lymphocytaire.

Un autre argument suggérant l'action possible de l'AZ sur la reconnaissance de l'antigène découle de nos expériences concernant l'inhibition des rosettes par l'AZ. Les cellules formant les rosettes spontanées (CFRs) sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène puisque leur déplétion spécifique d'une population de cellules spléniques normales rend cette population spécifiquement tolérante vis-à-vis de l'antigène utilisé pour les rosettes (6). Nous avons montré qu'une partie des CFRs était extrêmement sensible à l'action de l'AZ *in vivo* et *in vitro*, jusqu'à des concentrations de l'ordre de 0.1 ng/ml (10).

C. Cellules B et T - L'action élèctive de l'AZ sur les cellules T est suggérée par le fait que l'AZ agit exclusivement sur les CFR d'origine thymique (du moins aux basses concentrations, du niveau de celles présentes normalement dans l'organisme). L'azathioprine perd son action inhibitrice sur les CFR de la rate chez les souris thymectomisées à la naissance (15) et même chez les souris thymectomisées à l'âge adulte (11), ce qui suggère une action sur certaines sub-populations de lymphocytes T à vie courte. L'AZ n'est pas actif sur les CFRs de moelle osseuse mais le devient après incubation des cellules de moelle osseuse (présümées B) avec un extrait a-cellulaire de thymus, la thymosine (15 ,12). Ce phénomène a pu être proposé récemment comme une méthode d'évaluation *in vitro* des hormones thymiques (12). Enfin, l'AZ est actif sur les CFRs du thymus, qui sont des populations pures de cellules T (17 , 29). Nous avons d'ailleurs montré que les CFRs sensibles à l'AZ représentaient la même population que les CFRs porteuses de l'antigène thêta qui est un marqueur des cellules T (29).

REVUE GENERALE DU MODE D'ACTION DES IMMUNOSUPPRESSEURS AU NIVEAU CELLULAIRE

1/ Introduction

La réponse immunitaire vis-à-vis de certains antigènes, comme les globules rouges de mouton (GBM), fait intervenir la coopération de deux types de cellules, les cellules médullo-dépendantes, B, et thymodépendantes, T (1). Si les macrophages jouent sans doute un rôle au premier stade de la réponse immunitaire, ce sont les cellules thymodépendantes qui reconnaissent l'antigène et le présentent aux cellules B (1) selon des modalités encore inconnues. Il semble, du moins dans certains systèmes, que la cellule T pourrait reconnaître des motifs antigéniques différents de ceux de la cellule B et aurait un rôle de concentration de l'antigène sur les cellules B (57, 58). C'est ainsi que dans la réponse vis-à-vis d'un haptène et d'un "porteur", ce sont les cellules T qui reconnaîtraient le "porteur" et les cellules B qui reconnaîtraient l'haptène et produiraient l'anticorps anti-haptène. Les effets de la thymectomie néonatale peuvent être annulés par l'injection de fortes doses d'antigène, ce qui souligne encore la simple rôle de "helper" des cellules T vis-à-vis des cellules B. Les cellules B sont radiosensibles pour les réponses primaires et secondaires alors que les cellules T semblent uniquement radiosensibles pour les réponses primaires. Dans les jours qui suivent la stimulation par l'antigène, les cellules T se divisent, comme l'a montré DAVIES en suivant les mitoses des cellules T par un marqueur chromosomique (1). Certaines des cellules T sont à longue durée de vie et ont la propriété de recirculer, ce qui les différencie des cellules B (cellules T_2). D'autres cellules T (cellules T_1), précurseurs probables des T_2 , sont à courte durée de vie et ne recirculent pas (14). La technique des rosettes permet la détection des cellules B, T_1 , T_2 impliquées dans la reconnaissance de l'antigène (14, 40). Il a été montré (1, 54, 57, 62) que ce sont les cellules B qui produisent les anticorps.

Nous envisagerons successivement les différents arguments suggérant une action élective des immunosuppresseurs sur les populations B ou T. Trois aspects seront abordés : 1. action préférentielle sur les réactions humorales (B + T) ou à médiation cellulaire (T), 2. phase immunitaire sur laquelle agit le produit et 3. action élective sur les cellules B ou T.

2/ Azathioprine (Imurel®)

L'azathioprine (AZ) est un analogue des purines. C'est un inhibiteur de la synthèse du DNA, mais il est possible qu'il intervienne aussi à d'autres niveaux.

A. Réponses cellulaires et humorales - L'action immunosuppressive (i.s.) de l'AZ (ou de la 6-mercaptopurine, 6-MP) est beaucoup plus nette vis-à-vis des réactions cellulaires telles que le rejet d'homogreffes (31) ou l'hypersensibilité retardée (30) que des réponses humorales. Injecté à fortes doses à la souris, l'AZ supprime la synthèse des anticorps (61) mais chez l'homme, plusieurs auteurs ont rapporté une absence d'action (aux doses utilisées (3 mg/kg)) sur la synthèse des anticorps vis-à-vis de la flagelline (67), de l'influenza (37), de la toxine tétanique (37) et des antigènes brucelliens (37). Les seuls résultats nets sur la synthèse des anticorps ont été rapportés par SCHWARTZ (70), mais en utilisant des doses plus élevées. A ces mêmes doses de 3 mg/kg l'AZ n'empêche pas la fabrication d'anticorps bloquants après transplantation rénale si l'on en croit les récents travaux de HELLSTROM (65). On peut penser que l'action très remarquable de l'AZ dans les greffes d'organes est due à l'association d'une action i.s. élective sur les réactions cellulaires sans modification de la réponse humorale qui, dans ce cas particulier (anticorps "facilitants" ou "bloquants") jouent un rôle favorable. Si on admet que les réactions à médiation cellulaire dépendent étroitement des activités des cellules T alors que les réponses humorales sont surtout réalisées par les cellules B, l'action préférentielle de l'AZ sur les réactions cellulaires est une première indication de l'effet électif de ce produit sur les cellules T.

B. Phase de la réponse immunitaire - L'action de l'AZ sur la prolifération des lymphocytes, qui succède à la stimulation antigénique, a été suggérée par les travaux de BERENBAUM (23). Cet auteur a en effet montré que le moment optimum pour injecter une dose unique de 6-MP était le 2ème jour après la stimulation antigénique, c'est-à-dire le moment où la prolifération débute, d'où la possibilité envisagée par BERENBAUM d'une action essentiellement anti-proliférative de l'AZ. En fait, l'AZ a un métabolisme très rapide (demi-vie : 4 heures (3)), son activité biologique semble rapidement réversible, tant in vitro, testée sur l'inhibition des rosettes (10) ou sur la culture mixte des lymphocytes (20), qu'in vivo, puisqu'un traitement prolongé par la 6-MP ne prévient pas la synthèse d'anticorps si ce traitement est arrêté le jour de la stimulation antigénique. En outre, bien que les antigènes aient un métabolisme relativement rapide, ils persistent

dans l'organisme à un niveau immunogénique pendant plusieurs jours. Il apparaît donc que l'interprétation de BERENBAUM n'est pas absolument concluante car elle ne tient pas compte des facteurs énumérés ci-dessus (métabolisme et réversibilité rapides de l'AZ, persistance de l'immunogénicité pendant quelques jours). Un système purement in vitro, tel que le réalise la culture mixte de lymphocytes, permet de contrôler ces facteurs. Nous l'avons appliqué à l'AZ et à l'améthoptérine (Méthotrexate, MTX) (20). Il est apparu que l'AZ et le MTX inhibent tous deux l'incorporation de thymidine par les lymphocytes en culture mixte à des concentrations non cytotoxiques lorsqu'ils sont introduits dans la culture à son début. Placé dans la culture après la 24ème heure, l'AZ n'est plus efficace, par contre le MTX le reste s'il est introduit jusqu'au 4ème jour. Cette chronologie de l'action de l'AZ est au moins aussi compatible avec une action sur la reconnaissance de l'antigène que sur la prolifération lymphocytaire.

Un autre argument suggérant l'action possible de l'AZ sur la reconnaissance de l'antigène découle de nos expériences concernant l'inhibition des rosettes par l'AZ. Les cellules formant les rosettes spontanées (CFRs) sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène puisque leur déplétion spécifique d'une population de cellules spléniques normales rend cette population spécifiquement tolérante vis-à-vis de l'antigène utilisé pour les rosettes (6). Nous avons montré qu'une partie des CFRs était extrêmement sensible à l'action de l'AZ in vivo et in vitro, jusqu'à des concentrations de l'ordre de 0.1 ng/ml (10).

C. Cellules B et T - L'action élèctive de l'AZ sur les cellules T est suggérée par le fait que l'AZ agit exclusivement sur les CFR d'origine thymique (du moins aux basses concentrations, du niveau de celles présentes normalement dans l'organisme). L'azathioprine perd son action inhibitrice sur les CFR de la rate chez les souris thymectomisées à la naissance (15) et même chez les souris thymectomisées à l'âge adulte (11), ce qui suggère une action sur certaines sub-populations de lymphocytes T à vie courte. L'AZ n'est pas actif sur les CFRs de moelle osseuse mais le devient après incubation des cellules de moelle osseuse (présumées B) avec un extrait a-cellulaire de thymus, la thymosine (15 ,12). Ce phénomène a pu être proposé récemment comme une méthode d'évaluation in vitro des hormones thymiques (12). Enfin, l'AZ est actif sur les CFRs du thymus, qui sont des populations pures de cellules T (17 , 29). Nous avons d'ailleurs montré que les CFRs sensibles à l'AZ représentaient la même population que les CFRs porteuses de l'antigène thêta qui est un marqueur des cellules T (29).

Confirmant une action préférentielle de l'AZ sur les cellules T, l'AZ modifie spécifiquement la migration des cellules T dans l'organisme. Normalement, les cellules ganglionnaires (essentiellement T) migrent à parties à peu près égales dans les ganglions, le foie et la rate. Les cellules migrant dans les ganglions représentent bien une population T pratiquement pure puisque cette migration est électivement inhibée par la thymectomie néonatale et le traitement par le SAL (46). L'AZ provoque le même effet : diminution élective de la migration vers les ganglions des cellules ganglionnaires au profit de la rate sans augmentation importante de la migration hépatique (38). Ces résultats suggèrent que l'AZ modifie de façon préférentielle les cellules T, sans les détruire, (car après 24 - 48 h, l'action de l'AZ est réversible et les cellules regagnent les ganglions) mais plutôt en modifiant leur membrane.

Au total, les études biochimiques suggèrent que l'AZ agit en inhibant la synthèse de DNA, c'est-à-dire sans doute en supprimant les proliférations cellulaires qui succèdent à la stimulation antigénique. Les résultats que nous avons rapportés suggèrent que l'AZ pourrait avoir une action sur la reconnaissance de l'antigène par les cellules T sans doute sur leur membrane.

Est-elle responsable de l'action immunosuppressive de l'AZ ? On peut seulement dire qu'elle est plus compatible avec les effets de l'AZ sur les différents types de réactions immunitaires que ne le serait une simple action anti-proliférative.

3/ Améthoptérine (Methotrexate)

L'améthoptérine est un immunosuppresseur actif à la fois sur les réactions humorales et à médiation cellulaire. C'est un produit très actif mais dont l'emploi est limité par la toxicité à la fois hématologique et hépatique. En outre, son métabolisme est modifié par l'insuffisance rénale, ce qui rend son maniement difficile.

L'améthoptérine est actif dans les systèmes thymo-dépendants, comme la culture mixte de lymphocytes, ainsi que nous l'avons vu (20) et agit sur les lymphocytes pendant la phase proliférative. Cette action anti-proliférative est en accord avec le point d'impact biochimique présumé de ce produit, qui est l'inhibition de la réductase folique, c'est-à-dire une action directe sur la synthèse du DNA. L'améthoptérine est actif sur les rosettes spontanées d'origine thymique (13), mais beaucoup moins que l'AZ. Il s'agit là sans doute d'une action mineure bien que significative.

Au total, il n'y a pas d'arguments décisifs pour penser que l'améthoptérine agit de façon préférentielle sur les cellules B ou T. Les faits énumérés ci-dessus suggèrent plutôt qu'il agit sur les deux populations en empêchant leur prolifération.

4/ Cyclophosphamide (Endoxan)

Lorsqu'une souris a reçu une dose unique importante de cyclophosphamide, il faut lui donner à la fois des cellules thymiques et de moelle osseuse pour reconstruire sa compétence immunologique (44). Ce fait suggère, comme pour l'améthoptérine, que la cyclophosphamide touche à la fois les cellules B et T. Elle supprime d'ailleurs les réactions cellulaires et humorales. Son action sur le rejet des greffes nous semble maintenant un fait acquis si l'on en croit les expériences réalisées sur les greffes de peau chez la souris (24) et les greffes de rein chez le rat (68), et le fait que nous avons observé à l'Hôpital Necker, chez des malades ne tolérant pas l'AZ et conservant une fonction rénale acceptable sous traitement par la cyclophosphamide. En outre SCHWARTZ (69) a rapporté que la thymectomie à l'âge adulte potentialisait l'action immunosuppressive de la cyclophosphamide. Il semble néanmoins exister d'importantes différences d'action entre les espèces. C'est ainsi que la cyclophosphamide ne prolonge pas la survie des greffes de peau chez le cobaye (25). Dans cette espèce ce seraient exclusivement les cellules B qui seraient atteintes selon TURK ().

Il est possible de rendre des souris tolérantes aux globules rouges de mouton (GRM) en injectant des GRM après administration d'une forte dose de cyclophosphamide. On peut étudier, chez les animaux tolérants, la localisation des cellules tolérantes, c'est-à-dire quels sont les organes lymphoïdes qui perdent leur immuno-compétence spécifiquement vis-à-vis des GRM par des expériences de transfert. Les résultats varient selon les auteurs. PLAYFAIR (64) a rapporté que c'étaient les cellules de moelle osseuse qui étaient tolérantes, MANY et SCHWARTZ (51) les cellules thymiques, enfin MILLER et MITCHELL (56) les cellules du canal thoracique. Il est donc difficile de se prononcer, les protocoles expérimentaux étant différents. Une interprétation serait que, comme l'ont montré CHILLER et WEIGLE (33) pour la BSA, à la fois les cellules B et T sont tolérantes, mais que selon les modalités expérimentales, la tolérance est surtout nette au niveau des B ou des T.

Au total, comme pour l'améthoptérine, il n'existe pas d'arguments suggérant une action préférentielle sur les cellules B ou T, la cyclophosphamide agissant sans doute essentiellement par cytotoxicité spécifique pour les lymphocytes, mais n'ayant pas, jusqu'à maintenant, de spécificité prouvée pour l'une des catégories de lymphocytes. Le fait que chez l'homme traité de façon chronique par de la cyclophosphamide il y ait à la fois une dépression de la transformation blastique en présence de phytohémagglutinine (cellules T) et du pokeweed (cellules B), corrobore cette hypothèse. Lorsqu'une souris est traitée par la cyclophosphamide, le nombre de rosettes dans la rate diminue, mais proportionnellement à la diminution du nombre de lymphocytes (4).

5/ Cytosine arabinoside

La cytosine arabinoside mérite d'être citée dans cette revue, car elle a la particularité tout à fait remarquable d'être un excellent immunosuppresseur pour les réactions humorales (production d'anticorps), alors qu'elle ne supprime pas les réactions à médiation cellulaire (rejet des greffes), comme cela a été montré chez le chien (39). Ce produit, qui est un inhibiteur de la synthèse du RNA, a une action encore assez mal connue mais on peut penser qu'il agit essentiellement sur les cellules B. Il faut noter que dans le système des rosettes (43), la cytosine arabinoside n'a aucune action sur les cellules d'origine thymique.

6/ Corticoïdes

L'hydrocortisone administrée à fortes doses est immunosuppressive chez la souris (50). Cette action immunosuppressive est d'ailleurs modeste et variable selon les espèces. Elle semble plus nette pour les réponses humorales que pour les réponses cellulaires, ceci d'autant plus que l'effet anti-inflammatoire des corticoïdes fausse l'interprétation des études portant sur l'action de ces produits sur les réponses à médiation cellulaire, comme le rejet des greffes ou l'hypersensibilité retardée. L'effet immunosuppresseur des corticoïdes est obtenu uniquement lorsque le traitement précède la stimulation antigénique (50). Enfin, chez le rat, les corticoïdes détruisent de façon élective les lymphocytes à courte durée de vie (55).

L'hydrocortisone semble agir chez la souris sur les cellules B puisque la compétence immunologique peut être restaurée après traitement par les corticoïdes par des injections de cellules médullaires, mais pas par des cellules thymiques (35). En outre, si l'hydrocortisone diminue de façon très importante le nombre de cellules du thymus, les 3 à 5 % des thymocytes restant contiennent toutes les cellules capables d'induire une réaction de greffon contre l'hôte (29, 36), de coopérer avec la moelle osseuse (2) et de former des rosettes (20). Les lymphocytes sensibles à l'hydrocortisone n'ont donc aucun caractère des cellules T, ce qui est compatible avec l'action précédemment décrite sur les cellules B.

La cible cellulaire de l'hydrocortisone chez l'homme est moins bien connue. Certes, l'hydrocortisone supprime la réaction lymphocytaire mixte (32) et est active dans les crises de rejet dans les greffes d'organes, mais on peut penser, surtout pour les crises de rejet, qu'il ne s'agit pas d'une action immunosuppressive vraie, mais d'une action sur les macrophages (50) ou surtout, une action anti-inflammatoire. La rapidité même de l'effet des corticoïdes dans les crises (quelques heures (7)) est d'ailleurs peu compatible avec une action sur les phénomènes immunologiques.

7/ Sérums antilymphocytes (SAL)

Les SAL sont les plus puissants immunosuppresseurs que l'on connaisse et leur mode d'action a déjà été revu dans plusieurs travaux (8, 9, 47). Il faut sans doute distinguer différents modes d'action selon la dose ; il est très probable en effet que les doses administrées chez les souris, importantes et donnant une excellente immunosuppression, ont des effets biologiques différents des doses administrées chez l'homme, qui sont faibles et donnent des effets immunosuppresseurs discrets et même discutables dans certains systèmes.

A doses fortes ou moyennes, la SAL supprime les réactions à médiation cellulaire beaucoup mieux que les réactions humorales (47). Seules sont supprimées les productions d'anticorps vis-à-vis des antigènes "thymo-dépendants", c'est-à-dire celles vis-à-vis desquelles la production d'anticorps est déprimée par la thymectomie néonatale (45). La réponse vis-à-vis des antigènes non thymo-dépendants est au contraire augmentée dans certains cas.

Ceci suggère une action préférentielle des SAL sur les cellules T. Le fait que ces sérums agissent uniquement lorsqu'ils sont administrés avant l'antigène (26) va dans le même sens, suggérant que les SAL agissent sur les cellules T qui reconnaissent l'antigène. Des expériences de transfert (59) ont d'ailleurs montré que c'était bien sur les cellules reconnaissant l'antigène et non pas sur les cellules productrices d'anticorps qu'agissent les SAL.

Il manque une preuve directe de l'action élective des SAL sur les cellules T. En effet, il est possible de restaurer la compétence immunologique de souris traitées par le SAL par des injections de thymocytes (44,2) ou de thymosine (66), mais cette reconstitution est imparfaite et JEEJEEBHOY (44) a montré que pour d'assez fortes doses de SAL on pouvait obtenir une restauration partielle avec de la moelle osseuse. Il semble cependant qu'aux doses moyennes le thymus soit nettement meilleur que la moelle osseuse pour restaurer la compétence immunologique. La synergie avec la thymectomie adulte est un élément intéressant qui mérite d'être signalé (60), suggérant que pour voir réapparaître la compétence immunologique après un traitement par le SAL, il est nécessaire que le thymus soit présent, c'est-à-dire que les cellules atteintes par le SAL aient un rapport direct avec celui-ci. Nos observations récentes sur le rôle de la thymectomie adulte sur les CFR (11) suggèrent qu'il existe des cellules T_1 à courte durée de vie dans la rate, et T_2 à longue durée de vie dans les ganglions. Il est vraisemblable que ces cellules T_1 , qui sont supprimées par la thymectomie adulte, ont moins de chances de se trouver en présence de SAL que les cellules T_2 , présentes dans les ganglions. Ceci explique d'ailleurs que si la thymectomie adulte supprime les CFR de la rate, elle ne supprime pas celles des ganglions, qui sont donc électivement la cible des SAL.

Le dernier argument en faveur de l'action élective des SAL sur les lymphocytes T est le fait qu'après un traitement par le SAL, les aires des ganglions et de la rate qui sont déplétées de lymphocytes, sont les mêmes que celles qui sont déplétées après thymectomie néonatale (71). Plus précisément, il s'agit des aires para-corticales des ganglions et périartériolaires de la rate. Il semblerait donc que la migration des lymphocytes recirculant dans ces organes soit modifiée, ce que montre également l'étude de la migration des lymphocytes ganglionnaires marquées au CR 51 ; alors que normalement près de 20 % des lymphocytes ganglionnaires retournent dans les ganglions après injection à des souris, les SAL suppriment sélectivement, comme la thymectomie néonatale (et comme l'AZ) la migration de ces lymphocytes T vers les ganglions ().

Enfin, nous avons montré que les SAL étaient remarquablement actifs sur la formation des rosettes d'origine thymique, alors qu'ils sont beaucoup moins actifs sur les rosettes d'origine médullaire (15), ainsi que sur les plaques d'hémolyse qui sont toutes d'origine B (52). Nous avons montré une corrélation significative entre l'action immunosuppressive de 35 lots de SAL de souris et leur activité sur les CFR de la rate (5). Ces cellules étant des cellules T impliquées dans la reconnaissance de l'antigène, ceci paraît un argument important en faveur de l'action préférentielle des SAL sur les cellules T. Néanmoins, certains auteurs ont suggéré que les SAL agissaient sur les cellules T essentiellement parce que présents à fortes concentrations dans le sang où recirculent les lymphocytes T à vie longue. La destruction préférentielle des lymphocytes T serait ainsi expliquée, ceci d'autant plus que les lymphocytes T ont un renouvellement beaucoup plus lent que les lymphocytes B. Nos expériences montrent qu'in vitro les lymphocytes B et T ont une réactivité différente, indépendamment de situations anatomiques. Ceci a d'ailleurs été confirmé récemment par BERT et DAVIES (28) qui ont montré que la migration électrophorétique des lymphocytes du sang circulant d'animaux normaux ou appauvris en cellules T (c'est-à-dire contenant essentiellement des lymphocytes B) n'avaient pas la même sensibilité au traitement par le SAL. En d'autres termes, on peut penser que si les cellules T sont situées dans le sang circulant à fortes concentrations dans un compartiment où ils sont particulièrement vulnérables, néanmoins, en présence de concentrations équivalentes de SAL, la fonction des cellules T qui est liée essentiellement aux membranes est peut-être modifiée plus facilement et plus sensible à l'action des SAL que celle des cellules B. Il n'est pas possible, pour l'instant, de dire si cette différence de sensibilité aux SAL est due à des différences antigéniques entre les lymphocytes B et T ou à des différences fonctionnelles, ce que suggèrent plutôt d'autres expériences, concernant notamment l'AZ.

Un dernier point qui mérite d'être discuté est le mécanisme de l'inactivation des cellules T. Il peut s'agir d'une élimination par cytotoxicité ou opsonisation. La cytotoxicité ne nous semble pas un mécanisme majeur puisque le SAL garde toute son action chez les souris à qui manque le 5ème facteur du complément (27, 34). Il peut s'agir d'une opsonisation, qui nécessite uniquement les quatre premiers facteurs du complément. Ce mécanisme a été démontré chez la souris et une certaine corrélation a été trouvée entre l'action immunosuppressive des SAL et leur action opsonisante (41, 21). Néanmoins, cette corrélation est imparfaite et une

partie seulement des cellules T sont opsonisées. On peut aussi se demander pourquoi la canulation du canal thoracique ou l'irradiation extra-corporelle, qui entraînent une élimination presque totale du pool des lymphocytes T recirculants, ne sont pas aussi immunosuppresseurs qu'un traitement par le SAL qui n'entraîne qu'une opsonisation partielle des lymphocytes T.

Un autre mécanisme qui nous semble important à considérer est le recouvrement des lymphocytes par l'anticorps antilymphocyte, comme cela se produit dans l'inhibition des rosettes. Nous avons en effet montré que l'inhibition des rosettes se faisait par attachement de l'anticorps antilymphocyte à la surface des lymphocytes, puis des deux premiers facteurs du complément, C_1 et C_4 (16).

Cette inhibition est d'ailleurs réversible, montrant bien qu'il ne s'agit pas d'un mécanisme de cytotoxicité. Les molécules du complément C_1 et C_4 interviennent sans doute en modifiant la surface, c'est-à-dire en contribuant à l'effet d'inhibition stérique ou peut être en stabilisant l'anticorps à la surface du lymphocyte. Nous proposons comme alternative possible à l'action opsonisante des lymphocytes recirculants un recouvrement des lymphocytes T, qui seraient beaucoup plus sensibles que les lymphocytes B à ce recouvrement et cette action qui relève du blind-folding, proposée par LEVEY et MEDAWAR (49), pourrait précéder et compléter l'action opsonisante.

PARTIE EXPERIMENTALE - Inhibition de la culture mixte de lymphocytes par les antimétabolites

1 - Introduction

L'azathioprine (AZ) est utilisé dans le traitement préventif du rejet des greffes. La culture mixte de lymphocytes est un modèle in vitro de la réaction d'homogreffe. Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'action de l'AZ in vitro sur les cultures mixtes de lymphocytes et de la comparer à celle du Méthotrexate utilisé dans les mêmes conditions. L'AZ a été utilisé directement ou dans le sérum des sujets ayant ingéré une dose de 3 mg/kg du produit.

2 - Matériel et méthodes

A. Culture mixte - Les lymphocytes sont isolés à partir du sang périphérique de sujets normaux selon une technique utilisant un mélange de Ficoll et de Triosil (42). Les lymphocytes de deux populations allogéniques sont mis en suspension dans du milieu de Eagle contenant 250 ug/ml de streptomycine, 250 unités/ml de pénicilline G, 12,5 unités/ml de liouémine et 20 % de sérum humain décomplémenté (pool de plusieurs sérums). La concentration des lymphocytes est ajustée à 10^6 /ml (5×10^5 pour chacune des deux populations). Les cellules sont ensuite réparties dans des tubes de culture (tubes plastique Nunc 115 x 13 mm), à raison de 1 ml de suspension par tube dans la plupart des expériences et de 2 ml ou de 4 ml dans certaines d'entre elles. Des cultures témoins sont faites pour chacune des deux populations, contenant le même nombre de cellules que les cultures mixtes. Les tubes sont placés à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (5 %) pendant 5 jours (7 jours dans certains cas). Quatre heures avant l'arrêt de la culture, 1 uCi/ml de thymidine tritiée est introduit dans chaque tube. La précipitation de l'ADN cellulaire et le comptage en scintillation liquide sont réalisés selon la technique décrite par BAIN (22). Les résultats, exprimés en cpm, représentent la moyenne de 2 tubes.

B. L'AZ ou le Méthotrexate sont introduits dans les cultures mixtes à des concentrations échelonnées selon une progression géométrique de raison 10, tantôt au début de la culture, tantôt 24 ou 48 heures après.

C. Etude des métabolites sériques de l'AZ - Trois sujets normaux ont reçu 3 mg/kg d'AZ per os. Des prélèvements sanguins furent effectués avant la prise d'AZ (temps 0) puis 1, 2, 4, 12 et 24 heures après. Pour chaque sujet les différents sérums ainsi obtenus furent dilués dans du sérum du temps 0 et ces différentes dilutions introduites dans des cellules mixtes (à la place du sérum issu du "pool" habituellement utilisé) de façon à assurer une concentration finale en sérum de 25 %.

-:-:-:-

RESULTATS

C. Action de l'AZ - L'AZ, introduit dès le début de la culture, inhibe l'incorporation de la thymidine tritiée. Douze expériences ont été faites. Dans huit d'entre elles l'inhibition apparaît à la concentration de 19 ug/ml ; le chiffre de l'incorporation est alors inférieur à 20 % de celui de la culture mixte témoin réalisée sans AZ. Dans trois autres expériences, une inhibition (50 %) apparaît pour des concentrations plus faibles (0,01 ug et 0,1 ug/ml). Pour une seule expérience la dose de 10 ug/ml n'entraîne qu'une inhibition partielle de l'incorporation de thymidine (45 % de celle de la culture mixte témoin). A la concentration de 100 ug/ml, il n'existe plus aucune incorporation décelable de thymidine, le chiffre obtenu rejoignant celui du bruit de fond. A la dose habituellement inhibitrice de 10 ug/ml, le nombre et la viabilité des cellules, estimés dans certaines expériences lors de l'arrêt de la culture par la coloration au trypan, ne sont pas différents de ceux des témoins (entre 65 et 80 % de cellules viables). L'inhibition obtenue à la concentration de 10 ug/ml n'est donc pas le fait d'une cytotoxicité. Par contre, à la concentration de 100 ug/ml le pourcentage de cellules mortes est voisin de 100 %. (Fig. 1)

Dans quatre expériences une augmentation significative ($P < 0,001$) de l'incorporation de thymidine par rapport à la culture mixte témoin est observée pour les faibles concentrations d'AZ (de 0,001 ug/ml à 0,1 ug/ml). Cette augmentation est d'autant plus nette que l'AZ est introduit plus tard, 24 ou 48 heures après le début de la culture. Les chiffres obtenus varient entre 115 et 200 % de ceux de la culture mixte témoin réalisée sans AZ pour des concentrations de 0,001 ug et 0,01 ug/ml. Ces données suggèrent la possibilité d'une stimulation de certaines cultures mixtes par l'AZ à faibles concentrations. (Fig. 2).

Lorsque l'AZ est introduit 24 heures après le début de la culture, deux fois sur sept on observe une réduction de l'effet inhibiteur, l'incorporation étant alors 35 % de celle des cultures mixtes réalisées sans AZ. Introduit 48 heures après le début de la culture, l'AZ n'a plus aucun effet inhibiteur sur la culture mixte dans quatre des sept expériences réalisées. Dans deux autres expériences, cet effet existe encore, mais très diminué (les chiffres d'incorporation étant respectivement à 40 et 55 % de ceux des cultures mixtes témoins, au lieu de 20 % lorsque l'AZ est introduit dès le début). L'action de l'AZ s'exerce donc au cours des 48 premières heures, c'est-à-dire lors des phénomènes initiaux de la réponse immunitaire, alors qu'aucune incorporation de thymidine, et partant aucune synthèse de DNA, ni aucune mitose ne sont encore observées. (Fig. 3).

B. Action du Méthotrexate - Le Méthotrexate inhibe l'incorporation de thymidine par les lymphocytes en culture mixte. La concentration minima inhibitrice (c.m.i.) fut de 0,1 ug/ml dans cinq expériences et de 0,01 ug/ml dans une sixième. L'inhibition est plus nette quand la culture est poursuivie jusqu'au 7ème jour que jusqu'au 5ème. A ces concentrations, le Méthotrexate n'entraîne aucune cytotoxicité appréciée en comparant le pourcentage de cellules ayant pris le bleu trypan dans les tubes et sans Méthotrexate. L'inhibition est aussi nette quand on ajoute le Méthotrexate aux jours 1, 2, 3 ou 4 que si on l'ajoute au début de la culture (Fig.4,5). Aux basses concentrations (0,01 - 0,001 ug/ml), et surtout quand le Méthotrexate est ajouté dans la culture après le 4ème jour une stimulation de l'incorporation de thymidine est observée par rapport aux témoins.(Fig. 6).

C. Action du sérum de sujets ayant ingéré de l'AZ - La présence dans une culture mixte d'un sérum prélevé après ingestion d'AZ modifie la transformation blastique des lymphocytes de cette culture. La figure 7 représente les modifications observées en utilisant dans le milieu de culture des dilutions variables de 2 sérums prélevés l'un 2 heures, l'autre 12 heures après la prise de 3 mg/kg d'AZ. Aux plus fortes dilutions, un effet inhibiteur est noté sur la synthèse du DNA, effet qui s'accroît lorsqu'on augmente la concentration du sérum étudié. Néanmoins, à partir du 1/64ème pour le temps 2 heures et du 1/16ème pour le temps 12 heures, l'effet inhibiteur s'atténue pour disparaître à partir du 1/4. Dans deux cultures, un effet stimulant la transformation fut même noté. Des phénomènes analogues furent observés pour les autres prélèvements de sérum chez le même sujet et pour l'ensemble des prélèvements des deux autres sujets.

Les dilutions pour lesquelles l'effet inhibiteur maximal fut observé varient selon le temps après lequel les sérums sont prélevés. Ces dilutions furent en moyenne de 1/512ème à 1 heure, de 1/125ème à 2 heures, de 1/64ème à 4 heures, de 1/32ème à 24 heures. La courbe de ces dilutions est strictement parallèle à celle observée en utilisant le test d'inhibition des rosettes (3,18).(fig.8).

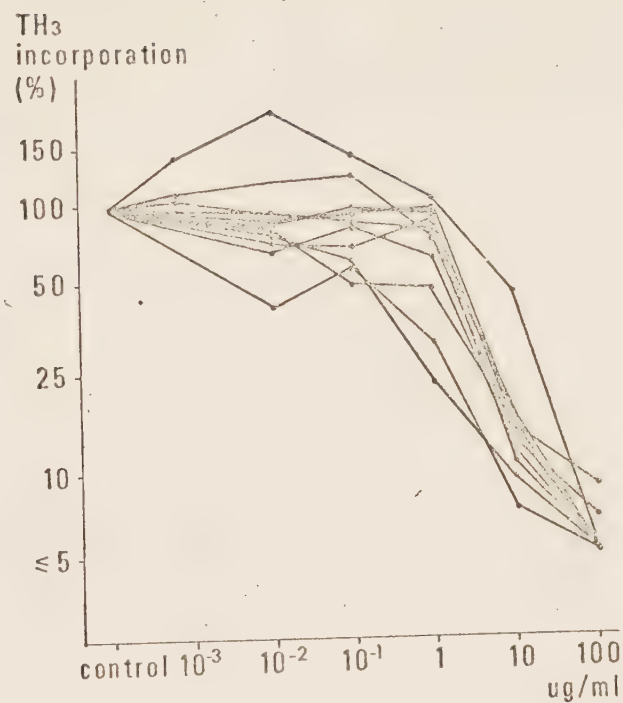


Fig. 1 : Inhibition de la CML par différentes concentrations d'AZ (onze cultures). L'incorporation de thymidine est donnée en pourcentage par rapport aux témoins (control), réalisés sans AZ.

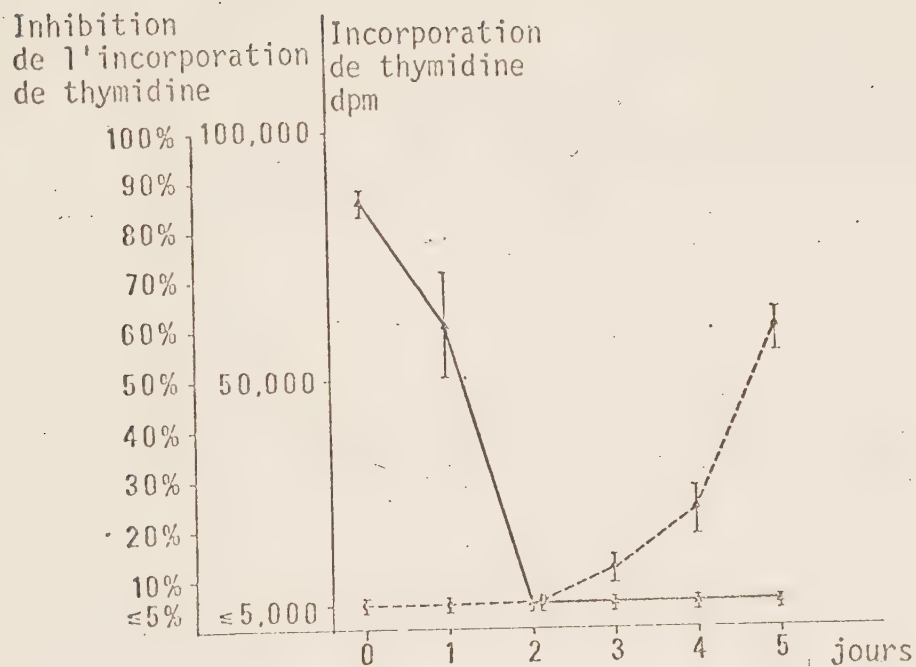


Fig. 2 : Inhibition de la culture mixte par l'Azathioprine. Les valeurs représentent (moyenne plus ou moins 2 E.S.) l'inhibition de l'incorporation de thymidine (moyenne + 2 E.S.) et l'incorporation de thymidine dans la culture (-----)

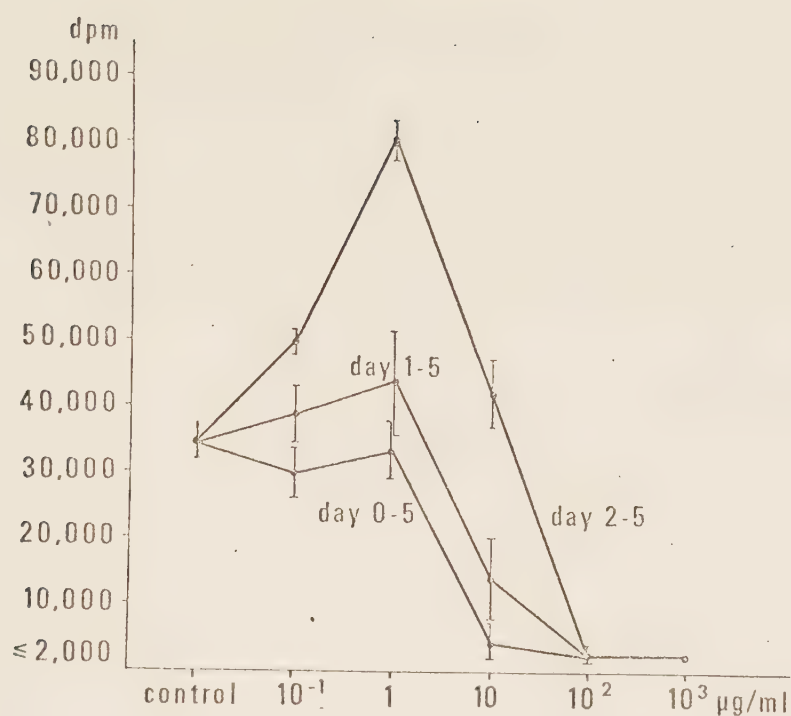


Fig. 3 : Effets de l'AZ sur l'incorporation de thymidine (dpm) par des lymphocytes en culture mixte lorsqu'il est ajouté en début de culture (jour 0-5), après 24 H (jour 1-5), ou après 48 H (jour 2-5). Les témoins (control) représentent la CML réalisée sans AZ (moyenne $\pm$ E.S.).

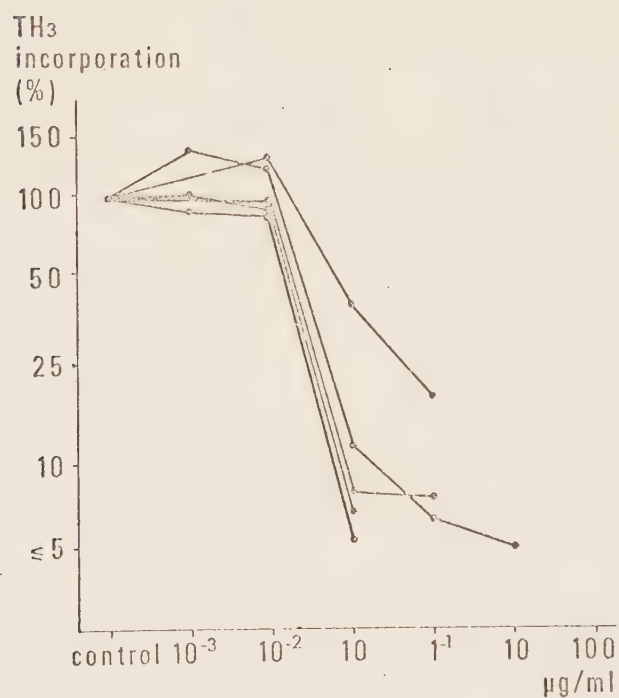


Fig. 4 : Inhibition de la CML par différentes concentrations de méthotrexate (cinq cultures). L'incorporation de thymidine est donnée en pourcentage par rapport aux témoins (control) réalisés sans méthotrexate.

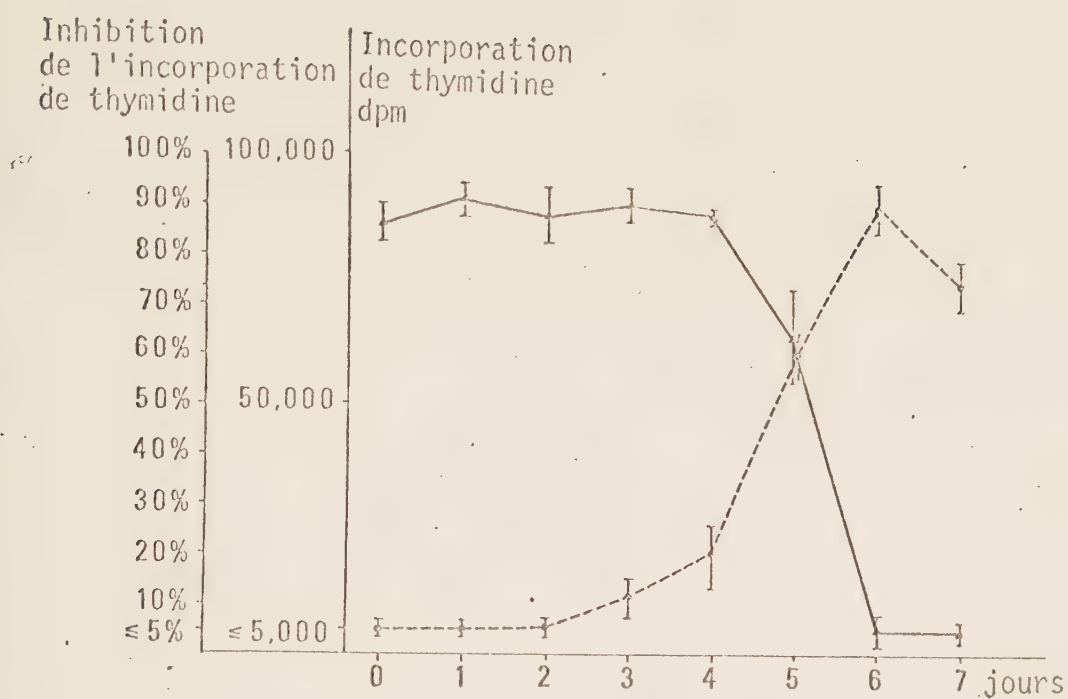


Fig 5: Inhibition de la culture mixte par le Methotrexate. Les valeurs représentent (moyenne plus ou moins 2 E.S.) l'inhibition de l'incorporation de thymidine (moyenne + 2 E.S.) et l'incorporation de thymidine dans la culture (-----)

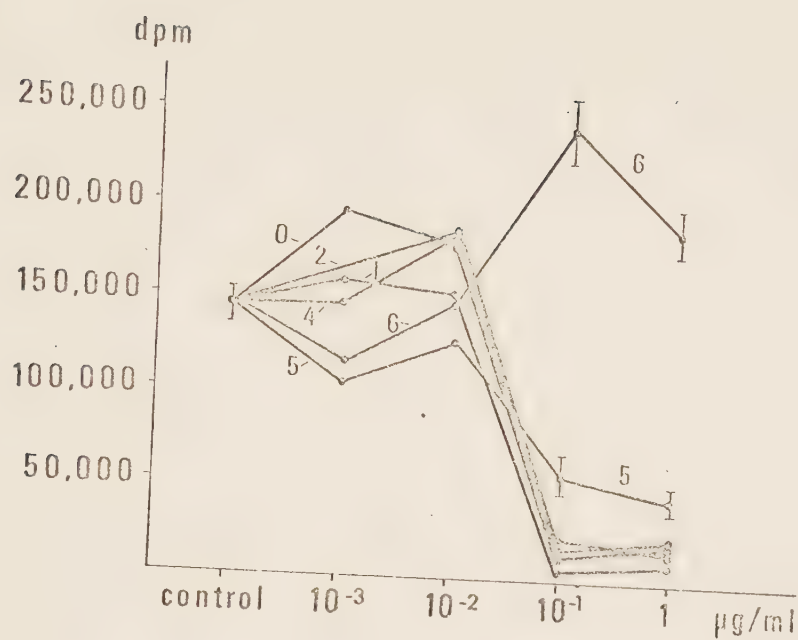


Fig. 6 : Effets du méthotrexate sur l'incorporation de thymidine (dpm) par des lymphocytes en culture mixte lorsqu'il est ajouté en début de culture (jour 0) ou après 1-6 jours (0,1,2,3,4,5,6). Les témoins (control) représentent les CML réalisées sans méthotrexate (moyenne $\pm$ E.S.).

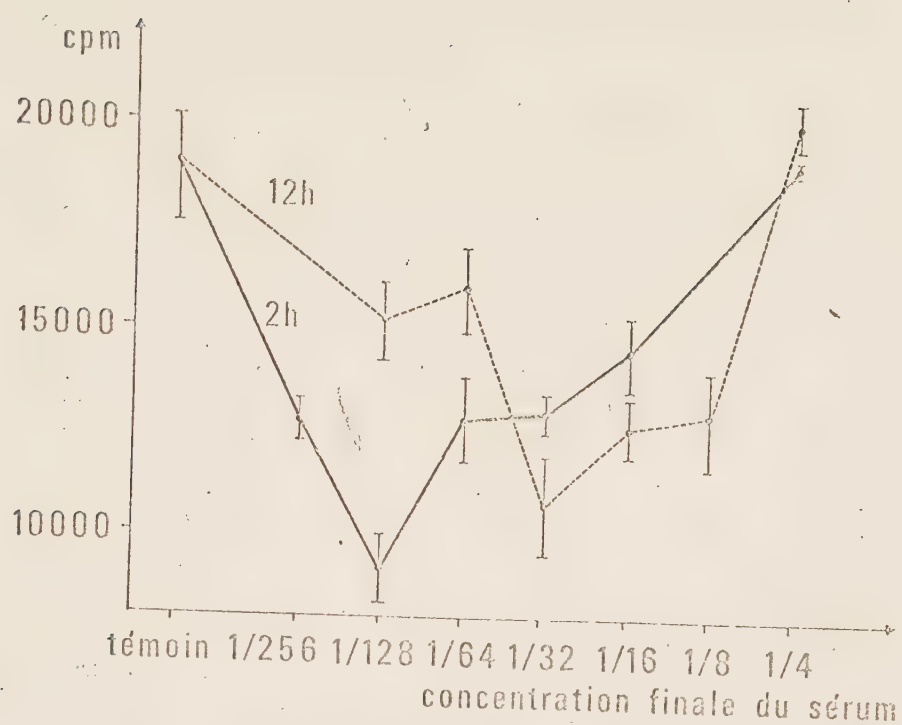


Fig. 7 : Inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée dans une culture mixte par le sérum d'un sujet traité par l'AZ. Les résultats représentés portent sur des prélèvements effectués 2 H et 12 H après la prise orale de 3 mg/kg d'AZ (moyenne $\pm$ 2 E.S.).

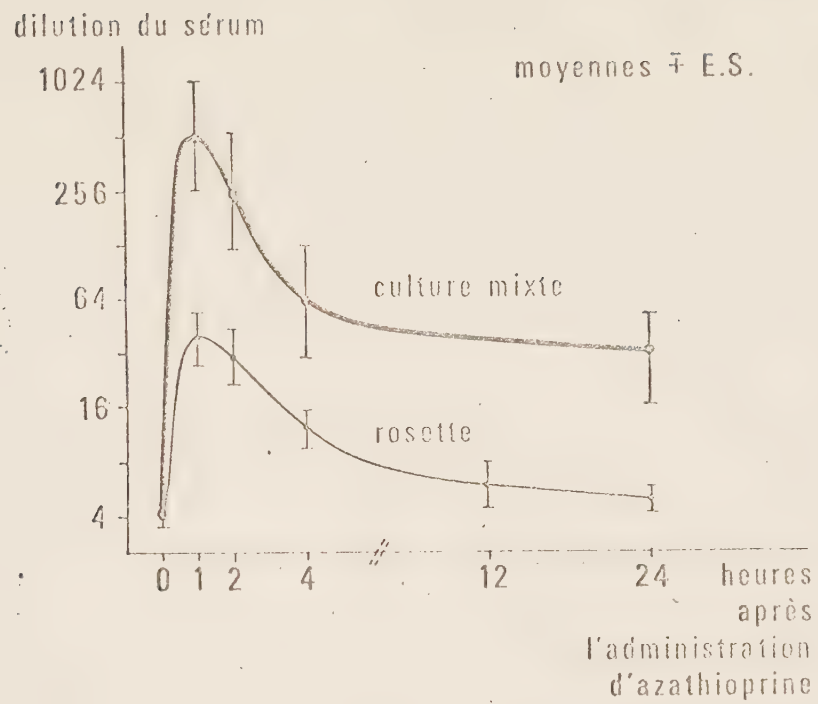


Fig. 8 : Comparaison de l'activité inhibante des rosettes et inhibante de la culture mixte des lymphocytes présente dans le sérum, de sujets ayant ingéré 3 mg/kg d'azathioprine.

DISCUSSION

Nos résultats montrent que si l'AZ et le Méthotrexate inhibent tous deux l'incorporation de thymidine par les lymphocytes en culture mixte, l'AZ est seulement actif lorsqu'il est ajouté avant la 48ème heure, alors que le Méthotrexate agit jusqu'au jour 4. Ces résultats sont en contradiction pour l'AZ avec ceux de BERENBAUM (23) selon lesquels in vivo le moment optimum d'injection pour obtenir une suppression de la production d'anticorps avec une dose unique de 6-MP ou de Méthotrexate est le jour + 2. BERENBAUM interprète ses résultats comme étant en faveur d'une action anti-proliférative des antimétabolites étudiés, puisque leur activité est maximale lorsqu'ils sont administrés au seuil de la phase proliférative de la réponse immunitaire. Notre interprétation est la même pour le Méthotrexate qui semble bien agir in vitro pendant la phase proliférative, ce qui d'ailleurs s'explique bien par l'action du Méthotrexate sur la folie-reductase, qui inhibe la synthèse du DNA. Nos résultats concernant l'AZ suggèrent une action de ce produit sur les phases les plus précoces de la réponse immunitaire et notamment la reconnaissance de l'antigène comme le suggèrent par ailleurs l'inhibition des rosettes par de très faibles concentrations d'AZ (3,10). Dans cette hypothèse, les données de BERENBAUM s'expliquent par le métabolisme rapide de l'AZ (quelques heures (3)) et sa réversibilité d'action au niveau cellulaire, démontrée in vitro pour les rosettes (10) et la culture mixte des lymphocytes (20) et in vivo. En effet, si l'AZ agit bien sur la reconnaissance de l'antigène s'il est administré en même temps, ou mieux avant l'antigène, il aura perdu son activité au jour 2 en raison de la rapidité de la dégradation et de la réversibilité d'action, alors que l'antigène est toujours à un niveau immunogène. Inversement, administré au jour 2, l'AZ inhibera la reconnaissance de l'antigène du jour 2 au jour 4 à un moment où cette reconnaissance continue et est toujours nécessaire à la poursuite de la réponse immunitaire (73) ; l'immunosuppression sera effective parce qu'au jour 4 l'antigène ne sera plus présent dans l'organisme à un niveau immunogène.

On peut noter par ailleurs que la culture mixte de lymphocytes est une réaction thymo-dépendante et que son inhibition par l'AZ apporte une preuve supplémentaire de l'action de ce produit sur les lymphocytes d'origine thymique (19).

La stimulation de l'incorporation de thymidine observée à la fois pour l'AZ et le Méthotrexate est mal comprise. Le Méthotrexate en interrompant le cycle de l'acide folique inhibe la conversion du DUMP en TMP qui nécessite le N^5, N^{10} - Met - THFA. Cette inhibition explique peut-être, aux doses non cytotoxiques, l'augmentation d'incorporation de thymidine due au Méthotrexate d'ailleurs déjà décrite pour la stimulation par la phytohémagglutinine (63, 32). Il est également possible que l'AZ stimule l'incorporation de thymidine par un mécanisme du même ordre en inhibant la synthèse du NAD alors que le $NADPH_2$ est nécessaire à l'activité de la reductase folique.

Les métabolites sériques de l'AZ ont été détectés par leur capacité d'inhiber la transformation des lymphocytes en culture mixte. Les résultats obtenus sont strictement parallèles à ceux observés par la technique d'inhibition des rosettes (3, 18). A fortes concentrations, le sérum de sujets ayant ingéré de l'AZ supprime l'effet inhibiteur des métabolites sériques ou même de l'AZ utilisé directement. La nature de cette suppression n'a pas été déterminée. Il est en outre difficile de savoir si cette suppression est liée à la technique de la culture mixte ou si elle représente un phénomène général intervenant dans l'action de l'AZ in vivo.

-:-:-

CONCLUSIONS

Il existe deux populations de lymphocytes : les lymphocytes thymodépendants (T) et les lymphocytes dérivés de la moelle osseuse (B) qui participent toutes deux, à des degrés divers, à la réponse immunitaire. L'AZ et la 6-MP sembleraient agir de façon assez élective sur les cellules T, au stade de la reconnaissance de l'antigène. L'améthoptérine et la cyclophosphamide agissent sans doute de façon non préférentielle, à la fois sur les lymphocytes B et T, le premier par une action anti-proliférative, le second par cytotoxicité. La cytosine arabinoside et les corticoïdes ont une action élective sur les cellules B. Enfin les SAL agissent de façon élective sur les cellules T. L'ensemble de ces données éclaire le mécanisme d'action de ces différents immunosuppresseurs et permet certaines recommandations dans le maniement clinique de ces produits, les cellules T devant être essentiellement éliminées lorsqu'il s'agit de rejet de greffe ou d'hypersensibilité retardée, les cellules B particulièrement visées lorsqu'il s'agit de maladies auto-immunes dans lesquelles on pense que les anticorps jouent un rôle fondamental.

L'AZ et le méthotrexate inhibent in vitro l'incorporation de thymidine par les lymphocytes en culture mixte à des concentrations non cytotoxiques. Ils exercent au contraire un effet stimulant à de plus faibles concentrations. L'effet inhibant de l'AZ disparaît lorsqu'il est introduit après la 24ème heure, alors que la Méthotrexate conserve toute son activité lorsqu'il est ajouté à la culture jusqu'au 4ème jour. Cette différence suggère que l'AZ agit sur les stades très précoces de la réponse immunitaire alors que le Méthotrexate est essentiellement un agent anti-prolifératif. La concentration des métabolites sériques détectés par l'inhibition de l'incorporation de thymidine en culture mixte évolue dans le temps parallèlement à celle des métabolites détectés par l'inhibition de la formation des rosettes. Le sérum des sujets ayant ingéré de l'AZ supprime, à fortes concentrations, l'inhibition de la transformation blastique par l'AZ ou ses métabolites sériques.

REFERENCES

1. "Antigen sensitive cells": Transpl.Rev. 1969, 1
2. B. ANDERSSON, H. BLOMGREN. "Evidence for a small pool of immunocompetent cells in the mouse thymus. Its role in the humoral antibody response against sheep erythrocytes bovin serum albumins, ovalbumin and the nip determinants." Cell.Immunol. 1970, 1, 362.
3. J.F. BACH, M. DARDENNE et C. FOURNIER. "In vitro evaluation of immunosuppressive drugs". Nature 1969, 222, 998.
4. J.F. BACH. "Mise en évidence d'une population de lymphocytes particulièrement sensible à certains immunosuppresseurs." C.R.Acad.Sci.Paris 1969, 268, 883.
5. J.F. BACH, M. DARDENNE, J. DORMONT et B. ANTOINE. "A new in vitro test evaluating antilymphocyte serum potency." Transpl.Proc. 1969, 1, 403.
6. J.F. BACH, J.Y. MULLER et M. DARDENNE. "In vivo specific antigen recognition by rosette forming cells." Nature 1970, 227, 1251.
7. J.F. BACH, et M. LESKI. "Rejection crises in human renal transplantation." Eur.J.Biol.Clin.Res. 1970, 15, 1048.
8. J.F. BACH. "Les sérums antilymphocytes. I." Rev.eur. et Clin.Biol. 1970, 15, 28.
9. J.F. BACH. " Les sérums antilymphocytes.II" Rev.eur. et Clin.Biol. 1970, 15, 258.
10. J.F. BACH, M. DARDENNE. "Activities of immunosuppressive agents in vitro. I. Rosette inhibition by azathioprine." Eur.J.clin.Biol.Res. 1971, 8, 770
11. J.F. BACH, M. DARDENNE et A.J.S. DAVIES. "Early effect of adult thymectomy". Nature, New Biology, 1971, 231, 110.
12. J.F. BACH, M. DARDENNE, A. GOLDSTEIN, A. GUHA et A. WHITE. "Appearance of T-cell markers in bone marrow rosette forming cells after incubation with purified thymosin, a thymic hormone." Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 1971 68, 2734.
13. J.F. BACH et M. DARDENNE. "The metabolism of azathioprine in renal failure." Transplantation, 1971, 12, 253.
14. J.F. BACH. " Les bases cellulaires de la production des anticorps.I, II et III. Presse méd. 1972. à paraître.
15. J.F. BACH et M. DARDENNE. "Antigen recognition by T lymphocytes. I. Thymus and bone marrow dependence of spontaneous rosette forming cells in normal and neonatally thymectomized mice." Cell.Immunol. à paraître.
16. J.F. BACH, I. GIGLI, M. DARDENNE et J. DORMONT. "Mechanism of complement action in rosette inhibition and lymphocytotoxicity by ALS." Immunology, à paraître.

17. J.F. BACH, et M. DARDENNE. "Antigen recognition by T lymphocytes. II. Similar effects of azathioprine, ALS and anti-theta serum on rosette forming lymphocytes in normal and neonatally thymectomized mice." Cell Immunol. à paraître
18. J.F. BACH et M. DARDENNE. "Serum immunosuppressive activity of azathioprine in normal subjects and patients with liver diseases." Proc.Roy. Soc.Med (London). à paraître.
19. J.F. BACH. "Antigen recognition by T cells and its suppression. Origin of rosette forming cells." Ann.Rheum.Dis. 1971, 30, 565.
20. M.A. BACH et J.F. BACH. "Activities of immunosuppressive agents in vitro. II. Different timing of azathioprine and methotrexate in inhibition and stimulation of mixed lymphocyte reaction." Clin.exp.Immunol. à paraître.
21. M.K. BACH, J.R. BRASHLER et R.J. PERPER. "Lymphocytophilic antibody titer as a correlative assay for the immunosuppressive activity of ALS." Transplantation, 1970, 9, 49.
22. B. BAIN. "Tritiated thymidine uptake in mixed leukocyte cultures : effect of specific activity and exposure time." Clin.exp.Immunol. 1970, 6, 255.
23. M.C. BERENBAUM. "The effect of cytotoxic agents on the production of antibody to TAB vaccine in the mouse." Biochem.Pharmacol. 1962, 11, 29.
24. M.C. BERENBAUM et I.N. BROWN. "Dose-response relationships for agents inhibiting the immune response". Immunology, 1964, 7, 65.
25. M.C. BERENBAUM. "Effect of cyclophosphamide on the homograft response in the guinea pig." Transplantation, 1965, 3, 671.
26. M.C. BERENBAUM. "Time dependent immunosuppressive effects of antithymocyte serum." Nature, 1967, 215, 148.
27. R.F. BARTH et G.F. CARROLL. "Immunosuppressive effects of ALS in complement deficient mice : evidence that immunocytolysis is not essential for ALS activity." J.Immunol 1970, 104, 521.
28. G. BERT, J.A. FORRESTER et A.J.S. DAVIES. "Differential response of B and T cells to ALS revealed by electrophoretic mobility determination." Nature, New Biology, 1971, 234, 87.
29. H. BLOMGREN et B. ANDERSSON. "Evidence for a small pool of immunocompetent cells in the mouse thymus." Exp.cell. Res. 1969, 57, 185.
30. Y. BOREL et R.S. SCHWARTZ. "Inhibition of immediate and delayed hypersensitivity in the rabbit by 6-MP" J.Immunol. 1964, 92, 754.
31. R. CALNE. "Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues" Transpl. Bull. 1961, 28, 445.
32. G.A. CARON. "The effect of antimetabolites and corticosteroids on lymphocyte transformation in vitro." In : Proc.3rd. Leucocyte Culture Conference W.O. Ricke edit., Appleton, Century Crofts, New York, p. 287.
33. J.M. CHILLER, G.S. HABICHT et N.O. WEIGLE. "Cellular sites of immunologic unresponsiveness." Proc.Nat.Acad.Sci.Washington, 1970, 65, 551.

34. B. CINADER, H.F. JEEJEEBHOY, S.W. KOH et A.G. RABBAT. "Immunosuppressive and graft-rejecting antibodies in the heterologous ALS." J.Exp.Med. 1971, 132, 1146.
35. J.J. COHEN et H.N. CLAMAN. "Thymus-marrow immunocompetence. V. Hydrocortisone-resistant cells and processes in the hemolytic antibody response of mice." J.exp.Med., 1971, 133, 1026.
36. J.J. COHEN, M. FISCHBACH et H.N. CLAMAN. "Hydrocortisone-resistance of graft versus host activity in mouse thymus, spleen and bone marrow." J.Immunol., 1970, 105, 1146.
37. E.J. DENMAN, A.M. DENMAN, B.M. GREENWOOD, P. GALL et R.B. HEATH. "Failure of cytotoxic drugs to suppress immune responses of patients with rheumatoid arthritis." Ann. Rheum.Dis. 1970, 29, 220.
38. C. FOURNIER et J.F. BACH. "Activities of immunosuppressive agents in vitro III. Elective alteration of recirculating lymphocytes after in vitro incubation with azathioprine". Soumis pour publication.
39. G.D. GRAY, R.J. PERPER, M.M. MICKELSON, J.A. CRIM et G.F. ZUKOWSKI. "The immunosuppressive activity of aracytidine (cytarabine)". Transplantation, 1969, 7, 183.
40. M.F. GREAVES. "Biological effects of anti-immunoglobulins : evidence for immunoglobulin receptors on T and B lymphocytes." Transpl.Rev. 1971, 1
41. M.F. GREAVES, A. TURSI, J.H.L. PLAYFAIR, G. TORRIGIANI, R. ZAMIC et I.M. ROITT. "Immunosuppressive potency and in vitro activity of anti-lymphocyte globulin". Lancet, 1969, 1, 68.
42. R. HARRIS et E.O. UKAEJIOFO. "Rapid preparation of lymphocytes for tissue typing." Lancet, 1969, 2, 327.
43. J. HAMBURGER, J. CROSNIER, J. DORMONT et J.F. BACH; " La Transplantation Rénale". Flammarion
44. H.F. JEEJEEBHOY. "The effect of heterologous antilymphocytes of thymus and marrow origin." J.Exp.Med., 1970, 132, 963.
45. R.S. KERBEL et D. EIDINGER. "Variable effects of ALS on humoral antibody formation : role of thymus dependency of antigen." J.Immunol. 1971, 106, 917.
46. E.M. LANCE et R.N. TAUB. "Segregation of lymphocyte populations through differential migration." Nature, 1969, 221, 841.
47. E.M. LANCE. "The selective action of ALS on recirculating lymphocytes : a review of the evidence and alternatives." Clin.Exp.Immunol. 1970, 6, 789
48. E.M. LANCE et R.N. TAUB. "Effects of heterologous ALS on the distribution of Cr-labeled lymphocytes in mice." Immunology, 1968, 15, 633.
49. R.H. LEVEY et P.B. MEDAWAR. "The mode of action of ALS in : Antilymphocyte serum. Ciba Foundation Study Group n°29, E.W. Wolstenhome and O'Connor edit. London, p.72.
50. J.A. MANNICK et R.H. EGDahl. "Endocrinologic agents." In : Human Transplantation. Rapaport et Dausset edit. New York Grune & Stratton, p.472.

51. A. MANY et R. SCHWARTZ. "Drug-induced immunological tolerance : site of action of crylophosphamide." Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1970, 133, 734.
52. N.J. MARTIN et J.F.A.P. MILLER. "Cell to cell interaction in the immune response. IV. Site of action of antilymphocyte globulin." J.exp.Med., 1968, 128, 865.
53. W.J. MARTIN et J.F.A.P. MILLER. " Assay for the immunosuppressive capacity of ALS based on its action on thymus derived cells." Int.Arch.All., 1969, 35, 163.
54. J.F.A.P. MILLER et G.F. MITCHELL. "Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes." J.exp.Med. 1968, 128, 821.
55. J.F.A.P. MILLER et L.S. COLE. " Resistance of long-lived lymphocytes and plasma cells in rat lymph node to treatment with prednisone, cyclophosphamide, 6-MP and actinomycin D." J.exp.Med. 1967, 126, 109.
56. J.F.A.P. MILLER et G.F. MITCHELL. "Cell to cell interaction in the immune response." J.exp.Med., 1970, 131, 675.
57. N.A. MITCHISON. "The carrier effect in the secondary response to hapten protein conjugates." I. Measurement of the effect with transferred cells and objection to the local environment hypothesis." Eur.J.Immunol. 1971, 1, 10.
58. N.A. MITCHISON. "The carrier effect in the secondary response to hapten protéin conjugates. II. Cellular cooperation." Eur.J.Immunol. 1971, 1, 18
59. G. MÖLLER et C. ZUKOWSKI. "Differential effect of heterologous ALS on antibody-producing cells and antigen-sensitive cells." J.Immunol., 1968; 101, 325.
60. A.P. MONACO, M.L. WOOD et P.S. RUSSELL. "Studies on heterologous ALS in mice. III. Immunologic tolerance and chimerism produced across the H2 locus with adult thymectomy and ALS." Ann.New York Acad.Sci. 1966, 129, 190.
61. H.C. NATHAN, S. BIEBER, G.B. ELION et G.M. HITCHINGS. "Detection of agents which interfere with the immune response." Proc.Soc.exp.Biol.Med. 1961, 107, 796
62. G.J.V. NOSSAL, A. CUNNINGHAM, G.F. MITCHELL et J.F.A.P. MILLER "Cell to cell interaction in the immune response". J.exp.Med. 1968, 128, 839.
63. L. PEGORARO, et G. BENZIO. "Effect of methotrexate on DNA synthesis and thymidine kinase activity of human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin." Experientia, 1971, 27, 33.
64. J.H.L. PLAYFAIR. " Specific tolerance to sheep erythrocytes in mouse bone marrow cells." Nature, 1969, 222, 882.

65. L.J. QUADRACCI, I.E. HELLSTROM, G.E. STRIKER, T.L. MARCHIOVO et K.E. HELLSTROM. "Immune mechanisms in human recipients of renal allografts." Cell Immunol., 1970, 1, 561.
66. J. QUINT, M.A. HARDY et A.P. MONACO. "Modification of the immunosuppressive effects of rabbit anti-mouse lymphocyte serum by a thymic humoral factor : thymosin." Surg. Forum, 1969, 20, 262.
67. J.M. ROWLEY, I.R. MACKAY et I.F.C. MCKENZIE. "Antibody production in immunosuppressed recipients of renal allografts." Lancet, 1969, 2, 708.
68. I.H. SHEADEH, R.D. GUHMAN et R.R. LINDQUIST. "Renal transplantation in the inbred rat." Transplantation, 1970, 10, 66.
69. R.S. SCHWARTZ. "Effect of cyclophosphamide on antibody formation and cellular immunity." in : Immunosuppressive properties of cyclophosphamide, Mead Johnson edit., 1971.
70. M.A. SWANSON et R.S. SCHWARTZ. "Immunosuppressive therapy. The relation between clinical response and immunological competence." New Engl.J.Med. 1967, 277, 163.
71. R.N. TAUB et E.M. LANCE. "Histopathological effects in mice of heterologous ALS." J.exp.Med., 1968, 128, 1281.
72. J.L. TURK et L.W. POULTER. "Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide." Clin.Exp.Immunol., 1972, 10, 285.
73. H. WIGZELL. "Use of humoral and cell-bound antibody to achieve depression of immunological reactivity." Antib.Chemother., 1969, 15, 82.

-:-:-:-

